

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

VERSION CORRIGÉE

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
16 octobre 2003 (16.10.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 03/085000 A1

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :

C08B 15/00, 15/06, 15/10, 3/00, 3/22, 31/00,  
33/00, 33/02, 35/00, 35/02, 37/08, C07B 57/00, G01N  
30/48, B01J 20/22, 20/32

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR03/01007

(22) Date de dépôt international : 1 avril 2003 (01.04.2003)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

02/04445 10 avril 2002 (10.04.2002) FR

(71) Déposant et

(72) Inventeur : OLIVEROS, Laureano [FR/FR]; 26, avenue  
Jean Moulin, F-75014 Paris (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,

SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,  
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale  
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si des modifications sont re-  
çues

(48) Date de publication de la présente version corrigée:

27 novembre 2003

(15) Renseignements relatifs à la correction:

voir la Gazette du PCT n° 48/2003 du 27 novembre 2003,  
Section II

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abrégiactions" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: CROSSLINKED POLYSACCHARIDE DERIVATIVES ON A SUPPORT AND METHOD FOR OBTAINING SAME

(54) Titre : DERIVES DE POLYSACCHARIDES RETICULES SUR UN SUPPORT ET LEUR MODE D'OBTENTION

(57) Abstract: The invention concerns crosslinked polysaccharide derivatives on a support or not, insoluble in organic solvents with high dissolving power such as boiling chloroform, ethyl acetate or acetone. Said derivatives can be used as chiral stationary phases for chromatography and enantioselective membranes for separating enantiomers. This is obtained simply from any polysaccharide derivative which can therefore consists a commercial product. The crosslinking reaction is carried out by means of a polyfunctional reagent which reacts with the residual free alcohol functions always present in any polysaccharide derivative. The reaction can be performed either by oven dry process at 80-150 °C or by reflux of a non-solvent of the polysaccharide derivative to be crosslinked such as heptane. The results of the stationary phases prepared in accordance with the invention exhibit good enantioselectivity in the splitting of racemic compounds by liquid chromatography.

(57) Abrégé : Dérivés de polysaccharides réticulés sur un support ou à l'état pur, insolubles dans les solvants organiques de grand pouvoir dissolvant tels que le chloroforme à ébullition, l'acétate d'éthyle ou l'acétone. Ils peuvent être utilisés comme phases stationnaires chirales pour la chromatographie et membranes énantiosélectives pour la séparation d'énantiomères. Ce résultat s'obtient très simplement à partir d'un quelconque dérivé de polysaccharide qui peut donc être un produit du commerce. La réaction de réticulation est réalisée au moyen d'un réactif polyfonctionnel qui réagit avec les fonctions alcool libres résiduelles toujours présentes dans tout dérivé de polysaccharide. La réaction peut se faire soit à sec à l'étuve à 80 - 150°C soit à reflux d'un non solvant du dérivé de polysaccharide à réticuler tel que l'heptane. Les résultats des phases stationnaires préparées selon le brevet montrent une bonne énantiosélectivité dans le dédoublement de composés racémiques par chromatographie liquide.

WO 03/085000 A1

### Dérivés de polysaccharides réticulés sur un support et leur mode d'obtention.

La présente invention concerne des dérivés de polysaccharides réticulés sur un support ou à l'état pur, leur préparation et leur utilisation pour la séparation de produits  
5 actifs à la lumière polarisée et notamment le dédoublement de composés racémiques. Les dérivés de polysaccharides de l'invention sont insolubles dans des solvants organiques de grand pouvoir dissolvant tels que le chloroforme à ébullition, le toluène, l'acétate d'éthyle ou l'acétone. Ce résultat est obtenu d'une manière extrêmement simple par réticulation d'un banal dérivé de polysaccharide préparé par les méthodes décrites dans la littérature  
10 chimique sans contrainte particulière.

Dans le domaine des médicaments et des produits à usage agricole, l'activité d'un composé chiral peut être très différente selon les stéréoisomères. Par exemple, il est connu que l'utilisation d'un médicament sous sa forme racémique peut avoir des conséquences  
15 dramatiques. D'où la nécessité de séparer les énantiomères des composés racémiques.

Si le dédoublement des composés racémiques se fait souvent par cristallisation de diastéréoisomères, les techniques chromatographiques sur support chiral connaissent depuis  
20 une vingtaine d'années un grand essor justifié par leur grande efficacité et la possibilité de séparer directement les énantiomères sans traitement préalable.

S'il existe actuellement un grand choix de supports chiraux pour dédoubler par  
25 chromatographie un composé racémique à l'échelle analytique, il n'en est pas de même à l'échelle préparative. Dans ce dernier cas, ce sont essentiellement des supports dont le sélecteur chiral est un dérivé de polysaccharide qui sont utilisés.

La cellulose en 1948 (C. E. Dent, Biochem. J. 43 (1948) 109) puis d'autres polysaccharides natifs ont été utilisés pour le dédoublement de composés racémiques. Leur  
30 énantiosélectivité est cependant médiocre et en 1973 G. Hesse et R. Hagel (Chromatographia 6 (1973) 277) ont montré qu'un dérivé de polysaccharide, en l'occurrence le triacétate de cellulose, conduisait à un support chiral plus énantiosélectif que le polysaccharide non dérivatisé.

Les dérivés de polysaccharides purs présentent quelques inconvénients lorsqu'ils  
35 sont utilisés comme support chiral dans une colonne chromatographique. Il s'agit principalement de leurs mauvaises propriétés mécaniques et leur gonflement par les solvants. Ces inconvénients sont devenus rédhibitoires avec la généralisation de la chromatographie liquide haute performance qui requiert l'emploi de colonnes sous pression.

En 1984 Y. Okamoto et *al.* (EP 0 281 951 A1 ; J. Am. Chem. Soc. 106 (1984) 5357) ont décrit des phases stationnaires chirales constituées de dérivés de cellulose et d'amylose et notamment des triphénylcarbamates déposés sur de la silice macroporeuse. Ces phases stationnaires ont été commercialisées avec un grand succès. Elles présentent cependant un  
5 inconvénient majeur : la solubilité du dérivé de polysaccharide dans de nombreux solvants habituels en chromatographie, ce qui oblige à n'utiliser comme éluants que des solvants compatibles avec la stabilité des phases stationnaires : des hydrocarbures tels que l'hexane et des alcools à petit nombre d'atomes de carbone. Or, dans le domaine des médicaments qui est le champ d'application le plus vaste de la chromatographie chirale, de nombreux  
10 composés racémiques à dédoubler sont très peu solubles dans les solvants compatibles avec la stabilité des phases stationnaires dans lesquelles le dérivé de polysaccharide est simplement déposé sur un support. Cela oblige à injecter dans la colonne chromatographique des solutions très diluées du composé racémique à dédoubler et donc à utiliser de grandes quantités de solvant. Toutes ces contraintes font que les phases  
15 stationnaires selon l'invention EP 0 281 951 A1 sont maintenant concurrencées par de nouveaux supports chromatographiques fixés au support et de grande stabilité face à des solvants organiques de grand pouvoir dissolvant.

Curieusement, alors que la réticulation et l'insolubilisation de la cellulose substituée par des groupements particuliers était connue depuis des décennies (USP 1 973  
20 493 (1934), USP 2 396 165 (1946)), ce n'est qu'à partir de 1987 que l'on voit paraître des articles qui décrivent l'obtention de phases stationnaires pour la chromatographie constituées de dérivés de polysaccharides fixés sur un support que ce soit par liaison chimique ou par réticulation.

Y. Okamoto et *al.* (EP 0 155 637 A2 (1985), J. Liq. Chromatogr. 10 (1987) 1613)  
25 déposent d'abord sur une  $\gamma$ -aminopropylsilice de la cellulose tritylée. Suit l'hydrolyse des groupes trityle ce qui a pour objet de régénérer la cellulose à la surface de la silice. Cela fait, la cellulose est ensuite fixée au support à l'aide d'un diisocyanate qui réagit avec les fonctions alcool de la cellulose et la fonction amine de la silice modifiée. Le polysaccharide ainsi fixé au support est enfin traité par un phénylisocyanate qui vient réagir avec ses  
30 groupes -OH. Cette méthode est longue et ne permet pas un contrôle aisé des diverses étapes et réactions mises en oeuvre.

En 1994 K. Kimata et *al.* (USP 5 302 633) fixent sur de la silice un dérivé de polysaccharide par réticulation d'une part et par liaison chimique d'autre part. Le dérivé de polysaccharide est le tris(4-vinylbenzoyl)cellulose dont la double liaison carbone-carbone

permet soit la réticulation du dérivé de polysaccharide sur le support, soit la copolymérisation avec de la silice si celle-ci porte elle-même une double liaison activée. Cette méthode de fixation d'un dérivé de polysaccharide sur un support présente deux inconvénients. D'abord, le groupe que l'on souhaite fixer sur le polysaccharide peut être  
5 d'accès difficile par le fait de la présence obligatoire d'une double liaison activée dans sa molécule. Ensuite, le grand nombre de doubles liaisons activées portées par le dérivé de polysaccharide fait que les points de réticulation ou de fixation au support seront nombreux ce qui affecte la structure secondaire du dérivé polysaccharidique. Or, il est connu que cela nuit aux performances de la phase stationnaire.

10 En 1994 L. Oliveros et *al.* (EP 0 738 284 B1 (1995), J. Liq. Chromatogr. 18 (1995) 1521) décrivent la préparation de phases stationnaires dont le sélecteur chiral est un dérivé polysaccharidique qui présente l'originalité d'être substitué par deux groupes différents : l'un sélectionné pour les qualités énantiosélectives qu'il confère au polysaccharide qui le porte, l'autre, en petite proportion et qui renferme une double liaison carbone-carbone  
15 aliphatique non activée, est destiné à la fixation du dérivé de polysaccharide sur le support. Cette fixation peut se faire par copolymérisation entre ledit dérivé et le support si celui-ci est fonctionnalisé comme par exemple l'allylsilice ou encore par réticulation de ce même dérivé sur des supports inertes tels que la silice vierge, l'alumine, le graphite, etc. L'importance de la réticulation peut ici être contrôlée par le nombre de groupes destinés à  
20 la fixation que l'on introduit dans la chaîne du polysaccharide. L'avantage des modes de fixation du dérivé de polysaccharide décrits ici, réticulation à la surface du support et liaison chimique au support, est leur grande facilité de mise en oeuvre comparativement aux publications antérieures.

En 1994 T. Murakami et *al.* (EP 0 656 333 A1) décrivent un mode de réticulation  
25 régiosélective d'un dérivé de polysaccharide à la surface d'une silice inactivée. Cette publication revendique de manière générale les phases stationnaires dont le sélecteur chiral est un dérivé de polysaccharide réticulé sur un support. Cependant, aucune indication n'est donnée quant aux préparations, caractéristiques et propriétés de telles phases stationnaires chirales excepté dans un cas particulier dont l'originalité est que la réticulation du dérivé de  
30 polysaccharide se fait de manière régiosélective par la fonction alcool primaire en position 6 des unités glucose dudit dérivé. Des trois exemples donnés, deux concernent la réticulation régiosélective par la position 6 des unités glucose de la cellulose, l'un est original et l'autre selon l'une des premières publications sur le sujet citée plus haut (EP 0 155 637 A2). Le troisième est un simple dépôt de tris(3,5-diméthylphenylcarbamate) de

cellulose sur un support comme dans la publication également citée plus haut (EP 0 281 951 A1), le support étant ici l'aminopropylsilice. Les phases stationnaires chirales décrites ici présentent l'inconvénient de nécessiter un grand nombre d'étapes pour leur préparation et en particulier une deuxième réaction de dérivatisation des fonctions alcool encore libres sur le dérivé de polysaccharide après sa réticulation. Enfin, les résultats chromatographiques présentés montrent que l'énantiosélectivité de telles phases stationnaires peut diminuer sensiblement et même s'annuler quand elles sont lavées avec des solvants organiques à grand pouvoir dissolvant ce qui indique une certaine instabilité.

En 1996 N. Enamoto et *al.* (Anal. Chem. 68 (1996) 2798) fixent sur de la silice et par deux méthodes différentes de l'amylose obtenue par polymérisation enzymatique d'un nombre déterminé d'unités d' $\alpha$ -D-glucose-1-phosphate. Cette amylose, fixée au support, est traitée par le 3,5-diméthylphénylisocyanate ce qui conduit au support chromatographique recherché. Les bonnes performances de ces phases stationnaires peuvent s'expliquer par la grande liberté conformationnelle de la chaîne du dérivé d'amylose qui n'est fixé au support que par une de ses extrémités. Une difficulté majeure de cette méthode est la polymérisation enzymatique des unités glucose et qui plus est ne peut conduire qu'à l'amylose.

En 1996 et 1997, E. Francotte et *al.* décrivent trois méthodes pour fixer des dérivés de polysaccharides sur des supports. Dans la première (WO 96/27615) le dérivé de polysaccharide portant un groupe photopolymérisable est déposé sur de la silice puis irradié avec une lampe à vapeur de mercure pendant environ 16 heures ce qui provoque sa réticulation. Dans la seconde (WO 97/04011) le dérivé de polysaccharide ne porte plus de groupe photopolymérisable. Comme précédemment, le dérivé de polysaccharide est déposé sur le support et réticulé par irradiation ultraviolette pendant environ 20 heures. Dans la troisième (WO 97/49733) le dérivé de polysaccharide et un initiateur de radicaux libres (l' $\alpha$ , $\alpha'$ -azobisisobutyronitrile ou AIBN) sont déposés sur le support puis chauffés à sec à 120°C pendant plusieurs heures. Il n'est pas dit, dans ces deux dernières publications, comment le dérivé de polysaccharide se fixe au support. Probablement que cela résulte de réactions de réticulation entre les chaînes du dérivé de polysaccharide par l'intermédiaire de radicaux libres formés par action du rayonnement ultraviolet, de la chaleur et de l'initiateur de radicaux libres utilisé en très grande quantité puisque sa proportion par rapport au dérivé de polysaccharide est en général dans le rapport 1/1.

Dans ces trois méthodes de réticulation de E. Francotte, on note, outre des temps de réaction très longs, que les quantités de solvant utilisées par rapport à la quantité de phase

stationnaire traitée sont très importantes. En outre, chacune d'elles nécessite une contraignante extraction au soxhlet de plusieurs heures afin d'éliminer le dérivé de polysaccharide non fixé au support. Enfin, l'utilisation de l' $\alpha,\alpha'$ -azobisisobutyronitrile, en de si grandes proportions à l'échelle industrielle et avec d'importantes variations de température, n'est pas sans risques si on considère l'instabilité de cet initiateur de radicaux libres.

En 1998 R. Duval et *al.* (EP 0 864 586 A2) décrivent la préparation de silices greffées de dérivés polysaccharidiques mais les exemples donnés ne diffèrent de ceux des publications de L. Oliveros et *al.* dont une est citée plus haut, que par la présence d'un pont oxygène dans la chaîne du substituant destiné à la fixation desdits dérivés.

L'importance de phases stationnaires chirales pour le dédoublement de composés racémiques à l'échelle préparative est toujours grande. De nouvelles méthodes ou techniques chromatographiques comme par exemple celle dite à lit mobile simulé (ou SMB de *simulating mobil bed*) sont aptes à produire d'importantes quantités d'énantiomères optiquement purs à partir d'un composé racémique. Pour ce faire, il est souhaitable que les phases stationnaires chirales utilisées présentent une grande capacité, soient particulièrement stables et supportent toutes sortes de solvants afin de travailler aux conditions optimales sans contraintes autres que celles propres à la séparation elle-même. Or, la capacité et l'énantiosélectivité des phases stationnaires dont le sélecteur chiral est un dérivé de polysaccharide sont grandes. Il s'ensuit que la recherche de phases stationnaires de ce type, stables et d'obtention aisée, est toujours d'actualité.

Une longue expérience sur le sujet a permis à l'auteur de cette invention de réaliser l'insolubilisation d'un dérivé de polysaccharide sur un support ou à l'état pur et ainsi obtenir des phases stationnaires chirales pour la chromatographie avec une extrême facilité et stables face aux solvants organiques de grand pouvoir dissolvant.

Cette invention met à profit les fonctions alcool libres résiduelles toujours présentes dans tout dérivé de polysaccharide, qu'il soit du commerce ou préparé sans contrainte particulière par les méthodes classiques décrites dans la littérature chimique. Ces fonctions alcool libres résiduelles se sont avérées suffisantes et surtout accessibles à divers réactifs bifonctionnels qui provoquent la réticulation et l'insolubilisation du dérivé de polysaccharide.

Un dérivé de polysaccharide selon la présente invention, insoluble dans des solvants organiques de grand pouvoir dissolvant tels le chloroforme à ébullition, le toluène, l'acétate d'éthyle ou l'acétone, est le produit résultant de l'action d'un réactif bifonctionnel sur les

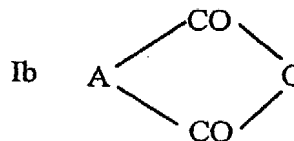
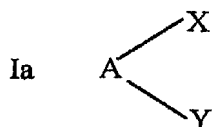
fonctions alcool libres résiduelles portées par un dérivé de polysaccharide de départ qui, lui, est soluble dans ces mêmes solvants.

Un dérivé de polysaccharide réticulé sur un support ou à l'état pur selon l'invention présente, outre sa facilité de préparation, d'autres avantages comme par exemple :

- 5
- La réticulation du dérivé de polysaccharide est dissociée de sa préparation.
  - Le dérivé de polysaccharide de départ peut être un produit du commerce.

Le réactif de réticulation porte ou est capable de donner naissance à au moins deux fonctions susceptibles de réagir avec les fonctions libres résiduelles du dérivé de polysaccharide que l'on souhaite réticuler. Il peut être représenté par les formules générales

10 Ia ou Ib :



Dans lesquelles :

- 15
- a) Les symboles X et Y, identiques ou différents, représentent chacun une fonction capable de réagir avec des groupes OH libres d'un dérivé de polysaccharide. De préférence X et Y représentent les groupes fonctionnels suivants : -N=C=O ou -SO<sub>2</sub>Cl ou -COCl ou -CO<sub>2</sub>H ou époxyde.
  - b) Le symbole A est un groupe alkyle ou un groupe aryle ou un groupe arylalkyle ou un groupe alkylaryle pouvant porter des substituants identiques ou différents choisis parmi les atomes d'halogène, les groupes alkyle, les groupes alkoxy, les groupes acyl, les groupes ester.
- 20

Les dérivés de polysaccharides destinés à être réticulés selon l'invention ont un degré de polymérisation compris entre 5 et 2000 et de préférence de 10 à 500.

Généralement, les dérivés de polysaccharides selon l'invention sont des dérivés de la cellulose, de l'amylose, du chitosan et de l'amylopectine.

- 25
- Les dérivés de polysaccharides destinés à être réticulés selon l'invention peuvent être des produits du commerce ou préparés, sans contraintes particulières, par les méthodes classiques décrites dans la littérature chimique. Leurs unités glucose portent des groupements ester -O-CO-R ou carbamate -O-CO-NH-R ou ester et carbamate.

- 30
- Le symbole R des groupements ester et carbamate portés par les dérivés de polysaccharide selon l'invention représente un groupe alkyle ou aryle ou arylalkyle ou alkylaryle dans lesquels les chaînes alkyle, de préférence de 1 à 6 atomes de carbone, peuvent être linéaires ou ramifiées et les noyaux benzéniques substitués ou non par un ou

plusieurs atomes ou groupes identiques ou différents choisis parmi les atomes d'halogène et les groupes alkyl ou alkoxy, de préférence de 1 à 3 atomes de carbone.

Un dérivé de polysaccharide selon l'invention est généralement obtenu par réticulation d'un dérivé de polysaccharide de départ déposé sur un support organique ou  
5 minéral ou à l'état pur sous forme de microbilles ou de feuilles.

Un dérivé de polysaccharide réticulé selon l'invention est généralement obtenu sur un support comme suit :

a) dissolution dans un solvant organique approprié du dérivé de polysaccharide à réticuler et d'un réactif capable de réagir avec au moins deux fonctions alcool résiduelles libres  
10 dudit dérivé, imprégnation du support chromatographique, évaporation du solvant, chauffage à sec entre 80 et 150°C pendant 1 à 2 heures et terminer par un lavage avec du chloroforme à reflux et de l'acétone à température ambiante.

ou :

b) dissolution dans un solvant organique approprié du dérivé de polysaccharide à réticuler et d'un réactif capable de réagir avec au moins deux fonctions alcool résiduelles libres  
15 du dérivé de polysaccharide, imprégnation du support chromatographique, évaporation du solvant, dispersion du produit obtenu dans un non solvant du dérivé de polysaccharide tel que l'heptane, chauffage à reflux de 10 à 20 heures, filtrer et terminer par un lavage avec du chloroforme à reflux et de l'acétone à température ambiante.

20 Un dérivé de polysaccharide réticulé selon l'invention est généralement obtenu à l'état pur comme suit :

a) imprégnation du dérivé de polysaccharide à réticuler sous forme de microbilles ou feuilles avec une solution, dans un non solvant dudit dérivé tel que l'heptane, d'un réactif capable de réagir avec au moins deux fonctions alcool résiduelles libres du  
25 dérivé de polysaccharide, évaporation du solvant, chauffage à sec entre 80 et 150°C pendant 1 à 2 heures et terminer par un lavage avec du chloroforme à reflux et de l'acétone à température ambiante.

ou :

b) imprégnation du dérivé de polysaccharide à réticuler sous forme de microbilles ou  
30 feuilles avec une solution, dans un non solvant dudit dérivé tel que l'heptane, d'un réactif capable de réagir avec au moins deux fonctions alcool résiduelles libres du dérivé de polysaccharide, chauffage à reflux pendant 10 à 20 heures et terminer par un lavage avec du chloroforme à reflux et de l'acétone à température ambiante.

Lorsque le dérivé de polysaccharide est réticulé selon l'invention sur un support, celui-ci est de préférence la silice, la silice modifiée, l'alumine, l'oxyde de titane, l'oxyde de zirconium, le graphite ou des matériaux comme le papier ou d'autres macromolécules naturelles ou synthétiques.

5 Les dérivés de polysaccharides réticulés et insolubilisés selon l'invention sont utiles pour la séparation d'un produit chimique d'un mélange, le dédoublement de composés racémiques et plus généralement la séparation de composés chiraux. Les méthodes utilisées pour ce faire sont essentiellement chromatographiques ou par diffusion énantiosélective au travers d'une membrane.

10 Les dérivés de polysaccharides réticulés et insolubilisés sur un support ou à l'état pur selon l'invention constituent des phases stationnaires chirales pour la chromatographie sur colonne ou sur couche mince, utiles pour la séparation d'un produit chimique d'un mélange, le dédoublement de composés racémiques et plus généralement la séparation de composés chiraux.

15 Exemple 1 :

2,6 grammes de silice de diamètre des particules 5  $\mu\text{m}$  et de porosité 100 angströms sont introduits dans un ballon renfermant une solution de 0,5 gramme de triacétylcellulose commercialisée par la société Fluka de masse molaire 37000 et dont le degré de substitution est de 2,48 et 0,4 gramme d'anhydride diacétyltartrique dans 50 mL de pyridine. Laisser sous agitation pendant quelques minutes et évaporer lentement le solvant sous pression réduite à environ 60°C. Chauffer à sec à 120°C pendant 1,5 heure. Laisser refroidir et reprendre par 50 mL de chloroforme sous agitation magnétique à la température ambiante pendant 2 heures et terminer en portant à reflux pendant 2 heures. Filtrer sur verre fritté, laver sur filtre d'abord avec du chloroforme puis avec de l'acétone. Sécher ; on obtient environ 3 grammes de support. Analyse centésimale : C 10,19%. Si cette silice est ensuite lavée de nouveau avec de la pyridine à la température ambiante pendant 2,5 heures sous agitation magnétique, filtrée et lavée sur filtre avec du chloroforme et de l'éther diéthylique, l'analyse centésimale indique alors 9,60% de carbone.

30 Exemple 2 :

On procède comme dans l'exemple 1 mais en partant d'une  $\gamma$ -aminopropylsilice (analyse centésimale : C 5,35%, H 1,68% et N 1,88%) obtenue à partir de la même silice vierge que celle utilisée dans l'exemple 1. Analyses centésimales : avant lavage avec de la pyridine %C=14,62 ; après lavage avec de la pyridine %C=12,55.

On note à partir de ces deux exemples :

- Que le dérivé de polysaccharide, en l'occurrence un produit commercial, a bien été rendu insoluble dans des solvants énergiques tels que le chloroforme à ébullition et l'acétone par une réaction de réticulation.
- Que si l'on tient compte du pourcentage de carbone dans la silice aminopropyle de départ, le taux de fixation du dérivé de cellulose sur le support est sensiblement le même sur l'aminopropylsilice que sur la silice vierge. Il est donc raisonnable de penser que l'insolubilisation du dérivé de polysaccharide est bien due essentiellement à la réticulation de ses chaînes.

#### Exemple 3 :

2,6 grammes de silice sphérique (diamètre des particules 5  $\mu\text{m}$ , porosité 100 Å, commercialisée sous la marque Nucleosil® par la société Macherey-Nagel) et désactivée par action de l'hexaméthylidisilazane selon EP 0 738 284 B1, sont introduits dans un ballon renfermant une solution de 0,55 gramme de tris(3,5-diméthylphényl)cellulose préparé selon les méthodes décrites dans la littérature à partir d'une cellulose Avicel® et dont le degré de substitution calculé à partir de son analyse centésimale est 2,83 et 0,4 gramme de 1,6-diisocyanohexane dans un mélange de 5 mL de pyridine et 35 mL de chloroforme. Laisser sous agitation magnétique pendant quelques minutes et évaporer lentement le solvant sous pression réduite à environ 60°C. Chauffer à sec le solide obtenu à 150°C pendant 2 heures. Laisser refroidir et reprendre par 50 mL de chloroforme sous agitation magnétique à la température ambiante pendant environ 2 heures et terminer en portant à reflux pendant 2 heures. Filtrer sur verre fritté, laver sur filtre d'abord avec du chloroforme puis avec de l'acétone. Sécher ; on obtient environ 3 grammes de support. Analyse centésimale : C 18,93 % ; H 2,73 % ; N 2,73 %.

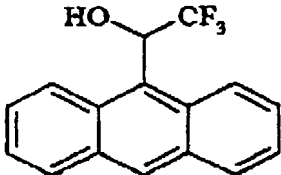
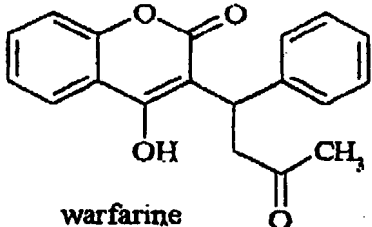
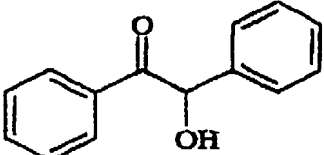
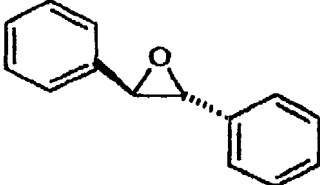
#### Exemple 4 :

On procède ici avec les mêmes produits et proportions que dans l'exemple 3 jusqu'à isolation de la silice imprégnée du dérivé de cellulose et du diisocyanate à l'état sec. Disperser le solide obtenu dans 50 mL de n-heptane contenant 0,5 mL de pyridine et 0,3 mL de 1,6-diisocyanohexane et chauffer à reflux pendant 20 heures. Filtrer et reprendre le solide dans 50 mL de chloroforme sous agitation magnétique à la température ambiante pendant 2 heures et terminer en portant à reflux pendant 2 heures. Filtrer sur verre fritté, laver sur filtre d'abord

avec du chloroforme puis avec de l'acétone. Sécher ; on obtient environ 3 grammes de support. Analyse centésimale : C 17,08 % ; H 2,40% ; N 2,23%.

#### Exemples d'application :

Deux colonnes chromatographiques de dimensions 15x0,46 cm remplies avec les phases stationnaires préparées selon les exemples 3 et 4 ont donné les résultats figurant dans le tableau ci-dessous. L'éluant est un mélange de n-heptane et 2-propanol dans les proportions 9 : 1 (volume : volume) et le flux de 1 mL/min.  $k'_1$  = facteur de capacité de l'énantiomère élué en premier ;  $\alpha$  = facteur de sélectivité ;  $R_s$  = facteur de résolution.

Composé racémique	Selon exemple 3			Selon exemple 4		
	$k'_1$	$\alpha$	$R_s$	$k'_1$	$\alpha$	$R_s$
 trifluoroanthryléthanol	2,10	2,27	2,10	2,49	2,05	2,65
 warfarine	2,17	1,78	1,51	2,49	2,21	2,50
 benzoïne	2,62	1,37	0,97	2,75	1,40	1,54
 trans-stilbène oxyde	0,65	1,78	1,58	0,79	1,49	1,56

## REVENDICATIONS

1. Dérivé de polysaccharide réticulé caractérisé en ce que sa réticulation se fait par les fonctions alcool libres résiduelles toujours présentes dans tout dérivé de polysaccharide, qu'il soit du commerce ou préparé sans contrainte particulière par les méthodes classiques décrites dans la littérature chimique.
2. Dérivé de polysaccharide réticulé selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un dérivé de cellulose, d'amylose, d'amylopectine ou de chitosan.
3. Dérivé de polysaccharide réticulé selon la revendication 1 caractérisé en ce que les substituants portés par ses unités glucose sont des groupements ester  $-O-CO-R$  ou des groupements carbamate  $-O-CO-NH-R$  ou des groupements ester et carbamate
4. Dérivé de polysaccharide réticulé selon la revendication 1 caractérisé en ce que le symbole R des groupements ester  $-O-CO-R$  et carbamate  $-O-CO-NH-R$  portés par ses unités glucose représente un groupe alkyle ou aryle ou arylalkyle ou alkylaryle dans lesquels les chaînes alkyle, de 1 à 6 atomes de carbone, peuvent être linéaires ou ramifiées et les noyaux benzéniques substitués ou non par un ou plusieurs atomes ou groupes identiques ou différents choisis parmi les atomes d'halogène et les groupes alkyl ou alkoxy de 1 à 3 atomes de carbone.
5. Phase stationnaire chirale utile pour la séparation d'isomères optiques et notamment le dédoublement de composés racémiques par les techniques chromatographiques, caractérisée en ce que le sélecteur chiral est un dérivé de polysaccharide selon la revendication 1 réticulé sur un support.
6. Phase stationnaire chirale utile pour la séparation d'isomères optiques et notamment le dédoublement de composés racémiques par les techniques chromatographiques caractérisée en ce que le sélecteur chiral est un dérivé de polysaccharide selon la revendication 1 réticulé à l'état pur.
7. Phase stationnaire chirale utile pour la séparation de composés chiraux par chromatographie selon la revendication 5 caractérisée en ce que le support est choisi parmi la silice, la silice inactivée, l'alumine, l'oxyde de zirconium, le graphite ou des matériaux comme le papier ou d'autres macromolécules naturelles ou synthétiques.
8. Phase stationnaire chirale utile pour la séparation de composés chiraux par chromatographie selon la revendication 6 caractérisée en ce que le dérivé de polysaccharide est utilisé sous forme de microbilles.

9. Méthode d'obtention d'un dérivé de polysaccharide réticulé selon la revendication 1 caractérisée en ce que la réaction de réticulation sur un support se fait selon :
- 5 a) dissolution dans un solvant organique approprié du dérivé de polysaccharide à réticuler et d'un réactif capable de réagir avec au moins deux fonctions alcool résiduelles libres du dérivé de polysaccharide, imprégnation du support chromatographique, évaporation du solvant sous pression réduite vers 60°C, chauffage à sec entre 80 et 150°C pendant 1 à 2 heures et terminer par un lavage avec du chloroforme à reflux et de l'acétone à température ambiante.
- 10 ou :
- 15 b) dissolution dans un solvant organique approprié du dérivé de polysaccharide à réticuler et d'un réactif capable de réagir avec au moins deux fonctions alcool résiduelles libres du dérivé de polysaccharide, imprégnation du support chromatographique, évaporation du solvant sous pression réduite vers 60°C, disperser le produit dans un solvant dans lequel le dérivé de polysaccharide n'est pas soluble tel que l'heptane, chauffer à reflux de 10 à 20 heures, filtrer et terminer par un lavage avec du chloroforme à reflux et de l'acétone à température ambiante.
- 20 10. Méthode d'obtention d'un dérivé de polysaccharide réticulé selon la revendication 1 caractérisée en ce que la réaction de réticulation à l'état pur se fait selon :
- 25 a) imprégnation du polysaccharide à réticuler sous forme de microbilles ou feuilles avec un réactif capable de réagir avec au moins deux fonctions alcool résiduelles libres du dérivé de polysaccharide en solution dans un solvant dans lequel ledit dérivé n'est pas soluble tel que l'heptane, évaporation du solvant sous pression réduite vers 60°C, chauffage à sec entre 80 et 150°C pendant 1 à 2 heures et terminer par un lavage avec du chloroforme à reflux et de l'acétone à température ambiante.
- 30 ou :
- b) imprégnation du polysaccharide à réticuler sous forme de microbilles ou feuilles avec un réactif capable de réagir avec au moins deux fonctions alcool résiduelles libres du dérivé de polysaccharide en solution dans un solvant dans lequel ledit dérivé n'est pas soluble tel que l'heptane, chauffage à reflux pendant 10 à 20

heures et terminer par un lavage du dérivé de polysaccharide réticulé avec du chloroforme à reflux et de l'acétone à température ambiante.

- 5
11. Phase stationnaire chirale utile pour la séparation de composés chiraux par chromatographie préparée selon la revendication 9 caractérisée en ce que le dérivé de polysaccharide réticulé sur un support, organique ou minéral, est un ester ou un carbamate ou à la fois ester et carbamate de cellulose, d'amylose, d'amylopectine ou de chitosan.
- 10
12. Phase stationnaire chirale utile pour la séparation de composés chiraux par chromatographie préparée selon la revendication 10 caractérisée en ce qu le dérivé de polysaccharide réticulé sous forme de microbilles est un ester ou un carbamate ou à la fois ester et carbamate de cellulose, d'amylose, d'amylopectine ou de chitosan.
- 15
13. Méthode d'obtention d'un dérivé de polysaccharide réticulé selon les revendications 9 et 10 caractérisée en ce que le réactif de réticulation est un anhydride ou un chlorure de diacide, un diacide, un diisocyanate ou un diépoxyde.
- 20
14. Membrane chirale utile pour la séparation d'isomères optiques et notamment le dédoublement de composés racémiques, caractérisée en ce qu'elle est constituée d'un dérivé de polysaccharide réticulé selon la revendication 10.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No

PCT/FR 03/01007

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7	C08B15/00	C08B15/06	C08B15/10	C08B3/00	C08B3/22
	C08B31/00	C08B33/00	C08B33/02	C08B35/00	C08B35/02
	C08B37/08	C07B57/00	G01N30/48	B01J20/22	B01J20/32

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C08B C07B G01N B01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 889 561 A (SUGIHARA ET AL.) 26 December 1989 (1989-12-26) claims; examples	1-4
X	EP 0 656 333 A (DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 7 June 1995 (1995-06-07) abstract page 2, line 35 - line 46 page 2, line 52 - page 6, line 16 page 5; example 1 claims	1-5, 7, 9, 11, 13



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 September 2003

Date of mailing of the international search report

22/09/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mazet, J-F

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 03/01007

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 281 951 A (DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 14 September 1988 (1988-09-14) abstract claims page 3, line 29 - line 32 page 3, line 56 - page 4, line 39 page 4, line 33 - line 34 ----	1-14
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 016, no. 066 (C-0912), 19 February 1992 (1992-02-19) & JP 03 261729 A (CHISSO CORP), 21 November 1991 (1991-11-21) abstract -----	1,2,6,8, 10,12
A	EP 0 157 364 A (DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 9 October 1985 (1985-10-09) page 5, line 10 - line 16 page 8, line 1 - page 9, line 12 page 10, line 16 - line 20 -----	5-8, 11-14
A	EP 0 527 236 A (DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 17 February 1993 (1993-02-17) page 3, line 46 - line 52 page 3, line 18 - line 29; claims -----	6,8,10, 12

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 03/01007

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4889561	A	26-12-1989	NONE	
EP 656333	A	07-06-1995	JP 3190206 B2	23-07-2001
			JP 8059702 A	05-03-1996
			DE 69412973 D1	08-10-1998
			DE 69412973 T2	14-01-1999
			EP 0656333 A1	07-06-1995
			KR 184294 B1	15-05-1999
			US 5587467 A	24-12-1996
			CN 1111057 A ,B	01-11-1995
			WO 9500463 A1	05-01-1995
EP 281951	A	14-09-1988	JP 1203402 A	16-08-1989
			JP 2563433 B2	11-12-1996
			DE 3850148 D1	21-07-1994
			DE 3850148 T2	22-09-1994
			EP 0281951 A1	14-09-1988
			EP 0552824 A2	28-07-1993
			US 4861872 A	29-08-1989
			JP 2108559 C	21-11-1996
			JP 8013844 B	14-02-1996
			JP 63178101 A	22-07-1988
JP 03261729	A	21-11-1991	JP 2896589 B2	31-05-1999
EP 157364	A	09-10-1985	JP 1833355 C	29-03-1994
			JP 5033210 B	19-05-1993
			JP 60226832 A	12-11-1985
			JP 1787409 C	10-09-1993
			JP 4075215 B	30-11-1992
			JP 60226833 A	12-11-1985
			DE 3579723 D1	25-10-1990
			EP 0157364 A2	09-10-1985
			US 4786415 A	22-11-1988
			US 5334311 A	02-08-1994
			US 4892659 A	09-01-1990
			US 5415769 A	16-05-1995
			US 5472599 A	05-12-1995
			US 5041226 A	20-08-1991
			US 5089138 A	18-02-1992
			US 5192444 A	09-03-1993
			US 5268098 A	07-12-1993
			US 4931184 A	05-06-1990
			US 5032277 A	16-07-1991
			US 5135653 A	04-08-1992
EP 527236	A	17-02-1993	DE 69226578 D1	17-09-1998
			DE 69226578 T2	24-12-1998
			EP 0527236 A1	17-02-1993
			US 5354852 A	11-10-1994
			JP 3181349 B2	03-07-2001
			JP 5070599 A	23-03-1993
			WO 9215635 A1	17-09-1992

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

ie Internationale No

PCT/FR 03/01007

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b>					
CIB 7	C08B15/00	C08B15/06	C08B15/10	C08B3/00	C08B3/22
	C08B31/00	C08B33/00	C08B33/02	C08B35/00	C08B35/02
	C08B37/08	C07B57/00	G01N30/48	B01J20/22	B01J20/32
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB					
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b>					
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)					
CIB 7 C08B C07B G01N B01J					
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche					
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)					
WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, EPO-Internal					
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>					
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents				no. des revendications visées
X	US 4 889 561 A (SUGIHARA ET AL.) 26 décembre 1989 (1989-12-26) revendications; exemples ---				1-4
X	EP 0 656 333 A (DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 7 juin 1995 (1995-06-07) abrégé page 2, ligne 35 - ligne 46 page 2, ligne 52 -page 6, ligne 16 page 5; exemple 1 revendications --- -/--				1-5,7,9, 11,13
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe					
* Catégories spéciales de documents cités: <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <p>*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div> <p>*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>					
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée			Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale		
15 septembre 2003			22/09/2003		
Norm et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale			Fonctionnaire autorisé		
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016			Mazet, J-F		

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Inde Internationale No

PCT/FR 03/01007

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 281 951 A (DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 14 septembre 1988 (1988-09-14) abrégé revendications page 3, ligne 29 - ligne 32 page 3, ligne 56 - page 4, ligne 39 page 4, ligne 33 - ligne 34 ----	1-14
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 016, no. 066 (C-0912), 19 février 1992 (1992-02-19) & JP 03 261729 A (CHISSO CORP), 21 novembre 1991 (1991-11-21) abrégé ----	1,2,6,8, 10,12
A	EP 0 157 364 A (DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 9 octobre 1985 (1985-10-09) page 5, ligne 10 - ligne 16 page 8, ligne 1 - page 9, ligne 12 page 10, ligne 16 - ligne 20 ----	5-8, 11-14
A	EP 0 527 236 A (DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 17 février 1993 (1993-02-17) page 3, ligne 46 - ligne 52 page 3, ligne 18 - ligne 29; revendications -----	6,8,10, 12

Formulaire PCT/ISA/210 (suite de la deuxième feuille) (juillet 1992)

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Inde Internationale No

PCT/FR 03/01007

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 4889561	A	26-12-1989	AUCUN	
EP 656333	A	07-06-1995	JP 3190206 B2	23-07-2001
			JP 8059702 A	05-03-1996
			DE 69412973 D1	08-10-1998
			DE 69412973 T2	14-01-1999
			EP 0656333 A1	07-06-1995
			KR 184294 B1	15-05-1999
			US 5587467 A	24-12-1996
			CN 1111057 A , B	01-11-1995
			WO 9500463 A1	05-01-1995
EP 281951	A	14-09-1988	JP 1203402 A	16-08-1989
			JP 2563433 B2	11-12-1996
			DE 3850148 D1	21-07-1994
			DE 3850148 T2	22-09-1994
			EP 0281951 A1	14-09-1988
			EP 0552824 A2	28-07-1993
			US 4861872 A	29-08-1989
			JP 2108559 C	21-11-1996
			JP 8013844 B	14-02-1996
			JP 63178101 A	22-07-1988
JP 03261729	A	21-11-1991	JP 2896589 B2	31-05-1999
EP 157364	A	09-10-1985	JP 1833355 C	29-03-1994
			JP 5033210 B	19-05-1993
			JP 60226832 A	12-11-1985
			JP 1787409 C	10-09-1993
			JP 4075215 B	30-11-1992
			JP 60226833 A	12-11-1985
			DE 3579723 D1	25-10-1990
			EP 0157364 A2	09-10-1985
			US 4786415 A	22-11-1988
			US 5334311 A	02-08-1994
			US 4892659 A	09-01-1990
			US 5415769 A	16-05-1995
			US 5472599 A	05-12-1995
			US 5041226 A	20-08-1991
			US 5089138 A	18-02-1992
			US 5192444 A	09-03-1993
			US 5268098 A	07-12-1993
			US 4931184 A	05-06-1990
			US 5032277 A	16-07-1991
			US 5135653 A	04-08-1992
EP 527236	A	17-02-1993	DE 69226578 D1	17-09-1998
			DE 69226578 T2	24-12-1998
			EP 0527236 A1	17-02-1993
			US 5354852 A	11-10-1994
			JP 3181349 B2	03-07-2001
			JP 5070599 A	23-03-1993
			WO 9215635 A1	17-09-1992

EP36686 (1)

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international(43) Date de la publication internationale  
16 octobre 2003 (16.10.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 03/085000 A1(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :C08B 15/00, 15/06, 15/10, 3/00, 3/22, 31/00,  
33/00, 33/02, 35/00, 35/02, 37/08, C07B 57/00, G01N  
30/48, B01J 20/22, 20/32DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,  
SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR03/01007

(22) Date de dépôt international : 1 avril 2003 (01.04.2003)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

02/04445 10 avril 2002 (10.04.2002) FR

(71) Déposant et

(72) Inventeur : OLIVEROS, Laureano [FR/FR]; 26, avenue  
Jean Moulin, F-75014 Paris (FR).(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,  
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale  
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si des modifications sont re-  
çuesEn ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: CROSSLINKED POLYSACCHARIDE DERIVATIVES ON A SUPPORT AND METHOD FOR OBTAINING SAME

(54) Titre : DERIVÉS DE POLYSACCHARIDES RÉTICULÉS SUR UN SUPPORT ET LEUR MODE D'OBTENTION

(57) Abstract: The invention concerns crosslinked polysaccharide derivatives on a support or not, insoluble in organic solvents with high dissolving power such as boiling chloroform, ethyl acetate or acetone. Said derivatives can be used as chiral stationary phases for chromatography and enantioselective membranes for separating enantiomers. This is obtained simply from any polysaccharide derivative which can therefore consists a commercial product. The crosslinking reaction is carried out by means of a polyfunctional reagent which reacts with the residual free alcohol functions always present in any polysaccharide derivative. The reaction can be performed either by oven dry process at 80-150 °C or by reflux of a non-solvent of the polysaccharide derivative to be crosslinked such as heptane. The results of the stationary phases prepared in accordance with the invention exhibit good enantioselectivity in the splitting of racemic compounds by liquid chromatography.

(57) Abrégé : Dérivés de polysaccharides réticulés sur un support ou à l'état pur, insolubles dans les solvants organiques de grand pouvoir dissolvant tels que le chloroforme à ébullition, l'acétate d'éthyle ou l'acétone. Ils peuvent être utilisés comme phases stationnaires chirales pour la chromatographie et membranes énantiosélectives pour la séparation d'énantiomères. Ce résultat s'obtient très simplement à partir d'un quelconque dérivé de polysaccharide qui peut donc être un produit du commerce. La réaction de réticulation est réalisée au moyen d'un réactif polyfonctionnel qui réagit avec les fonctions alcool libres résiduelles toujours présentes dans tout dérivé de polysaccharide. La réaction peut se faire soit à sec à l'étuve à 80 - 150°C soit à reflux d'un non solvant du dérivé de polysaccharide à réticuler tel que l'heptane. Les résultats des phases stationnaires préparées selon le brevet montrent une bonne énantiosélectivité dans le dédoublement de composés racémiques par chromatographie liquide.

WO 03/085000 A1

BEST AVAILABLE COPY

### Dérivés de polysaccharides réticulés sur un support et leur mode d'obtention.

La présente invention concerne des dérivés de polysaccharides réticulés sur un support ou à l'état pur, leur préparation et leur utilisation pour la séparation de produits  
5 actifs à la lumière polarisée et notamment le dédoublement de composés racémiques. Les dérivés de polysaccharides de l'invention sont insolubles dans des solvants organiques de grand pouvoir dissolvant tels que le chloroforme à ébullition, le toluène, l'acétate d'éthyle ou l'acétone. Ce résultat est obtenu d'une manière extrêmement simple par réticulation d'un banal dérivé de polysaccharide préparé par les méthodes décrites dans la littérature  
10 chimique sans contrainte particulière.

Dans le domaine des médicaments et des produits à usage agricole, l'activité d'un composé chiral peut être très différente selon les stéréoisomères. Par exemple, il est connu que l'utilisation d'un médicament sous sa forme racémique peut avoir des conséquences dramatiques. D'où la nécessité de séparer les énantiomères des composés racémiques.

15 Si le dédoublement des composés racémiques se fait souvent par cristallisation de diastéréoisomères, les techniques chromatographiques sur support chiral connaissent depuis une vingtaine d'années un grand essor justifié par leur grande efficacité et la possibilité de séparer directement les énantiomères sans traitement préalable.

S'il existe actuellement un grand choix de supports chiraux pour dédoubler par  
20 chromatographie un composé racémique à l'échelle analytique, il n'en est pas de même à l'échelle préparative. Dans ce dernier cas, ce sont essentiellement des supports dont le sélecteur chiral est un dérivé de polysaccharide qui sont utilisés.

La cellulose en 1948 (C. E. Dent, Biochem. J. 43 (1948) 109) puis d'autres polysaccharides natifs ont été utilisés pour le dédoublement de composés racémiques. Leur  
25 énantiosélectivité est cependant médiocre et en 1973 G. Hesse et R. Hagel (Chromatographia 6 (1973) 277) ont montré qu'un dérivé de polysaccharide, en l'occurrence le triacétate de cellulose, conduisait à un support chiral plus énantiosélectif que le polysaccharide non dérivatisé.

Les dérivés de polysaccharides purs présentent quelques inconvénients lorsqu'ils  
30 sont utilisés comme support chiral dans une colonne chromatographique. Il s'agit principalement de leurs mauvaises propriétés mécaniques et leur gonflement par les solvants. Ces inconvénients sont devenus rédhibitoires avec la généralisation de la chromatographie liquide haute performance qui requiert l'emploi de colonnes sous pression.

En 1984 Y. Okamoto et *al.* (EP 0 281 951 A1 ; J. Am. Chem. Soc. 106 (1984) 5357) ont décrit des phases stationnaires chirales constituées de dérivés de cellulose et d'amylose et notamment des triphénylcarbamates déposés sur de la silice macroporeuse. Ces phases stationnaires ont été commercialisées avec un grand succès. Elles présentent cependant un  
5 inconvénient majeur : la solubilité du dérivé de polysaccharide dans de nombreux solvants habituels en chromatographie, ce qui oblige à n'utiliser comme éluants que des solvants compatibles avec la stabilité des phases stationnaires : des hydrocarbures tels que l'hexane et des alcools à petit nombre d'atomes de carbone. Or, dans le domaine des médicaments qui est le champ d'application le plus vaste de la chromatographie chirale, de nombreux  
10 composés racémiques à dédoubler sont très peu solubles dans les solvants compatibles avec la stabilité des phases stationnaires dans lesquelles le dérivé de polysaccharide est simplement déposé sur un support. Cela oblige à injecter dans la colonne chromatographique des solutions très diluées du composé racémique à dédoubler et donc à utiliser de grandes quantités de solvant. Toutes ces contraintes font que les phases  
15 stationnaires selon l'invention EP 0 281 951 A1 sont maintenant concurrencées par de nouveaux supports chromatographiques fixés au support et de grande stabilité face à des solvants organiques de grand pouvoir dissolvant.

Curieusement, alors que la réticulation et l'insolubilisation de la cellulose substituée par des groupements particuliers était connue depuis des décennies (USP 1 973  
20 493 (1934), USP 2 396 165 (1946)), ce n'est qu'à partir de 1987 que l'on voit paraître des articles qui décrivent l'obtention de phases stationnaires pour la chromatographie constituées de dérivés de polysaccharides fixés sur un support que ce soit par liaison chimique ou par réticulation.

Y. Okamoto et *al.* (EP 0 155 637 A2 (1985), J. Liq. Chromatogr. 10 (1987) 1613)  
25 déposent d'abord sur une  $\gamma$ -aminopropylsilice de la cellulose tritylée. Suit l'hydrolyse des groupes trityle ce qui a pour objet de régénérer la cellulose à la surface de la silice. Cela fait, la cellulose est ensuite fixée au support à l'aide d'un diisocyanate qui réagit avec les fonctions alcool de la cellulose et la fonction amine de la silice modifiée. Le polysaccharide ainsi fixé au support est enfin traité par un phénylisocyanate qui vient réagir avec ses  
30 groupes -OH. Cette méthode est longue et ne permet pas un contrôle aisé des diverses étapes et réactions mises en oeuvre.

En 1994 K. Kimata et *al.* (USP 5 302 633) fixent sur de la silice un dérivé de polysaccharide par réticulation d'une part et par liaison chimique d'autre part. Le dérivé de polysaccharide est le tris(4-vinylbenzoyl)cellulose dont la double liaison carbone-carbone

permet soit la réticulation du dérivé de polysaccharide sur le support, soit la copolymérisation avec de la silice si celle-ci porte elle-même une double liaison activée. Cette méthode de fixation d'un dérivé de polysaccharide sur un support présente deux inconvénients. D'abord, le groupe que l'on souhaite fixer sur le polysaccharide peut être d'accès difficile par le fait de la présence obligatoire d'une double liaison activée dans sa molécule. Ensuite, le grand nombre de doubles liaisons activées portées par le dérivé de polysaccharide fait que les points de réticulation ou de fixation au support seront nombreux ce qui affecte la structure secondaire du dérivé polysaccharidique. Or, il est connu que cela nuit aux performances de la phase stationnaire.

En 1994 L. Oliveros et *al.* (EP 0 738 284 B1 (1995), J. Liq. Chromatogr. 18 (1995) 1521) décrivent la préparation de phases stationnaires dont le sélecteur chiral est un dérivé polysaccharidique qui présente l'originalité d'être substitué par deux groupes différents : l'un sélectionné pour les qualités énantiosélectives qu'il confère au polysaccharide qui le porte, l'autre, en petite proportion et qui renferme une double liaison carbone-carbone aliphatique non activée, est destiné à la fixation du dérivé de polysaccharide sur le support. Cette fixation peut se faire par copolymérisation entre ledit dérivé et le support si celui-ci est fonctionnalisé comme par exemple l'allylsilice ou encore par réticulation de ce même dérivé sur des supports inertes tels que la silice vierge, l'alumine, le graphite, etc. L'importance de la réticulation peut ici être contrôlée par le nombre de groupes destinés à la fixation que l'on introduit dans la chaîne du polysaccharide. L'avantage des modes de fixation du dérivé de polysaccharide décrits ici, réticulation à la surface du support et liaison chimique au support, est leur grande facilité de mise en oeuvre comparativement aux publications antérieures.

En 1994 T. Murakami et *al.* (EP 0 656 333 A1) décrivent un mode de réticulation régiosélective d'un dérivé de polysaccharide à la surface d'une silice inactivée. Cette publication revendique de manière générale les phases stationnaires dont le sélecteur chiral est un dérivé de polysaccharide réticulé sur un support. Cependant, aucune indication n'est donnée quant aux préparations, caractéristiques et propriétés de telles phases stationnaires chirales excepté dans un cas particulier dont l'originalité est que la réticulation du dérivé de polysaccharide se fait de manière régiosélective par la fonction alcool primaire en position 6 des unités glucose dudit dérivé. Des trois exemples donnés, deux concernent la réticulation régiosélective par la position 6 des unités glucose de la cellulose, l'un est original et l'autre selon l'une des premières publications sur le sujet citée plus haut (EP 0 155 637 A2). Le troisième est un simple dépôt de tris(3,5-diméthylphenylcarbamate) de

cellulose sur un support comme dans la publication également citée plus haut (EP 0 281 951 A1), le support étant ici l'aminopropylsilice. Les phases stationnaires chirales décrites ici présentent l'inconvénient de nécessiter un grand nombre d'étapes pour leur préparation et en particulier une deuxième réaction de dérivatisation des fonctions alcool encore libres  
5 sur le dérivé de polysaccharide après sa réticulation. Enfin, les résultats chromatographiques présentés montrent que l'énantiosélectivité de telles phases stationnaires peut diminuer sensiblement et même s'annuler quand elles sont lavées avec des solvants organiques à grand pouvoir dissolvant ce qui indique une certaine instabilité.

En 1996 N. Enamoto et *al.* (Anal. Chem. 68 (1996) 2798) fixent sur de la silice et  
10 par deux méthodes différentes de l'amylose obtenue par polymérisation enzymatique d'un nombre déterminé d'unités d' $\alpha$ -D-glucose-1-phosphate. Cette amylose, fixée au support, est traitée par le 3,5-diméthylphénylisocyanate ce qui conduit au support chromatographique recherché. Les bonnes performances de ces phases stationnaires peuvent s'expliquer par la grande liberté conformationnelle de la chaîne du dérivé  
15 d'amylose qui n'est fixé au support que par une de ses extrémités. Une difficulté majeure de cette méthode est la polymérisation enzymatique des unités glucose et qui plus est ne peut conduire qu'à l'amylose.

En 1996 et 1997, E. Francotte et *al.* décrivent trois méthodes pour fixer des dérivés de polysaccharides sur des supports. Dans la première (WO 96/27615) le dérivé de  
20 polysaccharide portant un groupe photopolymérisable est déposé sur de la silice puis irradié avec une lampe à vapeur de mercure pendant environ 16 heures ce qui provoque sa réticulation. Dans la seconde (WO 97/04011) le dérivé de polysaccharide ne porte plus de groupe photopolymérisable. Comme précédemment, le dérivé de polysaccharide est déposé sur le support et réticulé par irradiation ultraviolette pendant environ 20 heures. Dans la  
25 troisième (WO 97/49733) le dérivé de polysaccharide et un initiateur de radicaux libres ( $l'\alpha,\alpha'$ -azobisisobutyronitrile ou AIBN) sont déposés sur le support puis chauffés à sec à 120°C pendant plusieurs heures. Il n'est pas dit, dans ces deux dernières publications, comment le dérivé de polysaccharide se fixe au support. Probablement que cela résulte de réactions de réticulation entre les chaînes du dérivé de polysaccharide par l'intermédiaire de  
30 radicaux libres formés par action du rayonnement ultraviolet, de la chaleur et de l'initiateur de radicaux libres utilisé en très grande quantité puisque sa proportion par rapport au dérivé de polysaccharide est en général dans le rapport 1/1.

Dans ces trois méthodes de réticulation de E. Francotte, on note, outre des temps de réaction très longs, que les quantités de solvant utilisées par rapport à la quantité de phase

stationnaire traitée sont très importantes. En outre, chacune d'elles nécessite une contraignante extraction au soxhlet de plusieurs heures afin d'éliminer le dérivé de polysaccharide non fixé au support. Enfin, l'utilisation de l' $\alpha,\alpha'$ -azobisisobutyronitrile, en de si grandes proportions à l'échelle industrielle et avec d'importantes variations de température, n'est pas sans risques si on considère l'instabilité de cet initiateur de radicaux libres.

En 1998 R. Duval et *al.* (EP 0 864 586 A2) décrivent la préparation de silices greffées de dérivés polysaccharidiques mais les exemples donnés ne diffèrent de ceux des publications de L. Oliveros et *al.* dont une est citée plus haut, que par la présence d'un pont oxygène dans la chaîne du substituant destiné à la fixation desdits dérivés.

L'importance de phases stationnaires chirales pour le dédoublement de composés racémiques à l'échelle préparative est toujours grande. De nouvelles méthodes ou techniques chromatographiques comme par exemple celle dite à lit mobile simulé (ou SMB de *simulating mobil bed*) sont aptes à produire d'importantes quantités d'énantiomères optiquement purs à partir d'un composé racémique. Pour ce faire, il est souhaitable que les phases stationnaires chirales utilisées présentent une grande capacité, soient particulièrement stables et supportent toutes sortes de solvants afin de travailler aux conditions optimales sans contraintes autres que celles propres à la séparation elle-même. Or, la capacité et l'énantiosélectivité des phases stationnaires dont le sélecteur chiral est un dérivé de polysaccharide sont grandes. Il s'ensuit que la recherche de phases stationnaires de ce type, stables et d'obtention aisée, est toujours d'actualité.

Une longue expérience sur le sujet a permis à l'auteur de cette invention de réaliser l'insolubilisation d'un dérivé de polysaccharide sur un support ou à l'état pur et ainsi obtenir des phases stationnaires chirales pour la chromatographie avec une extrême facilité et stables face aux solvants organiques de grand pouvoir dissolvant.

Cette invention met à profit les fonctions alcool libres résiduelles toujours présentes dans tout dérivé de polysaccharide, qu'il soit du commerce ou préparé sans contrainte particulière par les méthodes classiques décrites dans la littérature chimique. Ces fonctions alcool libres résiduelles se sont avérées suffisantes et surtout accessibles à divers réactifs bifonctionnels qui provoquent la réticulation et l'insolubilisation du dérivé de polysaccharide.

Un dérivé de polysaccharide selon la présente invention, insoluble dans des solvants organiques de grand pouvoir dissolvant tels le chloroforme à ébullition, le toluène, l'acétate d'éthyle ou l'acétone, est le produit résultant de l'action d'un réactif bifonctionnel sur les

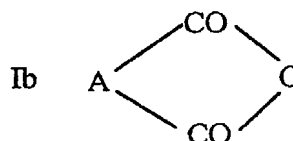
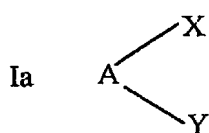
fonctions alcool libres résiduelles portées par un dérivé de polysaccharide de départ qui, lui, est soluble dans ces mêmes solvants.

Un dérivé de polysaccharide réticulé sur un support ou à l'état pur selon l'invention présente, outre sa facilité de préparation, d'autres avantages comme par exemple :

- 5 - La réticulation du dérivé de polysaccharide est dissociée de sa préparation.
- Le dérivé de polysaccharide de départ peut être un produit du commerce.

Le réactif de réticulation porte ou est capable de donner naissance à au moins deux fonctions susceptibles de réagir avec les fonctions libres résiduelles du dérivé de polysaccharide que l'on souhaite réticuler. Il peut être représenté par les formules générales

10 Ia ou Ib :



Dans lesquelles :

- a) Les symboles X et Y, identiques ou différents, représentent chacun une fonction capable de réagir avec des groupes OH libres d'un dérivé de polysaccharide. De préférence X et Y représentent les groupes fonctionnels suivants : -N=C=O ou -SO<sub>2</sub>Cl ou -COCl ou -CO<sub>2</sub>H ou époxyde.
- 15 b) Le symbole A est un groupe alkyle ou un groupe aryle ou un groupe arylalkyle ou un groupe alkylaryle pouvant porter des substituants identiques ou différents choisis parmi les atomes d'halogène, les groupes alkyle, les groupes alkoxy, les groupes acyl, les groupes ester.
- 20

Les dérivés de polysaccharides destinés à être réticulés selon l'invention ont un degré de polymérisation compris entre 5 et 2000 et de préférence de 10 à 500.

Généralement, les dérivés de polysaccharides selon l'invention sont des dérivés de la cellulose, de l'amylose, du chitosan et de l'amylopectine.

- 25 Les dérivés de polysaccharides destinés à être réticulés selon l'invention peuvent être des produits du commerce ou préparés, sans contraintes particulières, par les méthodes classiques décrites dans la littérature chimique. Leurs unités glucose portent des groupements ester -O-CO-R ou carbamate -O-CO-NH-R ou ester et carbamate.

- 30 Le symbole R des groupements ester et carbamate portés par les dérivés de polysaccharide selon l'invention représente un groupe alkyle ou aryle ou arylalkyle ou alkylaryle dans lesquels les chaînes alkyle, de préférence de 1 à 6 atomes de carbone, peuvent être linéaires ou ramifiées et les noyaux benzéniques substitués ou non par un ou

plusieurs atomes ou groupes identiques ou différents choisis parmi les atomes d'halogène et les groupes alkyl ou alkoxy, de préférence de 1 à 3 atomes de carbone.

Un dérivé de polysaccharide selon l'invention est généralement obtenu par  
réticulation d'un dérivé de polysaccharide de départ déposé sur un support organique ou  
5 minéral ou à l'état pur sous forme de microbilles ou de feuilles.

Un dérivé de polysaccharide réticulé selon l'invention est généralement obtenu sur un support comme suit :

a) dissolution dans un solvant organique approprié du dérivé de polysaccharide à réticuler et d'un réactif capable de réagir avec au moins deux fonctions alcool résiduelles libres  
10 dudit dérivé, imprégnation du support chromatographique, évaporation du solvant, chauffage à sec entre 80 et 150°C pendant 1 à 2 heures et terminer par un lavage avec du chloroforme à reflux et de l'acétone à température ambiante.

ou :

b) dissolution dans un solvant organique approprié du dérivé de polysaccharide à réticuler et d'un réactif capable de réagir avec au moins deux fonctions alcool résiduelles libres  
15 du dérivé de polysaccharide, imprégnation du support chromatographique, évaporation du solvant, dispersion du produit obtenu dans un non solvant du dérivé de polysaccharide tel que l'heptane, chauffage à reflux de 10 à 20 heures, filtrer et terminer par un lavage avec du chloroforme à reflux et de l'acétone à température ambiante.

20 Un dérivé de polysaccharide réticulé selon l'invention est généralement obtenu à l'état pur comme suit :

a) imprégnation du dérivé de polysaccharide à réticuler sous forme de microbilles ou  
feuilles avec une solution, dans un non solvant dudit dérivé tel que l'heptane, d'un  
réactif capable de réagir avec au moins deux fonctions alcool résiduelles libres du  
25 dérivé de polysaccharide, évaporation du solvant, chauffage à sec entre 80 et 150°C pendant 1 à 2 heures et terminer par un lavage avec du chloroforme à reflux et de l'acétone à température ambiante.

ou :

b) imprégnation du dérivé de polysaccharide à réticuler sous forme de microbilles ou  
30 feuilles avec une solution, dans un non solvant dudit dérivé tel que l'heptane, d'un réactif capable de réagir avec au moins deux fonctions alcool résiduelles libres du dérivé de polysaccharide, chauffage à reflux pendant 10 à 20 heures et terminer par un lavage avec du chloroforme à reflux et de l'acétone à température ambiante.

Lorsque le dérivé de polysaccharide est réticulé selon l'invention sur un support, celui-ci est de préférence la silice, la silice modifiée, l'alumine, l'oxyde de titane, l'oxyde de zirconium, le graphite ou des matériaux comme le papier ou d'autres macromolécules naturelles ou synthétiques.

5 Les dérivés de polysaccharides réticulés et insolubilisés selon l'invention sont utiles pour la séparation d'un produit chimique d'un mélange, le dédoublement de composés racémiques et plus généralement la séparation de composés chiraux. Les méthodes utilisées pour ce faire sont essentiellement chromatographiques ou par diffusion énantiosélective au travers d'une membrane.

10 Les dérivés de polysaccharides réticulés et insolubilisés sur un support ou à l'état pur selon l'invention constituent des phases stationnaires chirales pour la chromatographie sur colonne ou sur couche mince, utiles pour la séparation d'un produit chimique d'un mélange, le dédoublement de composés racémiques et plus généralement la séparation de composés chiraux.

15 Exemple 1 :

2,6 grammes de silice de diamètre des particules 5  $\mu\text{m}$  et de porosité 100 angströms sont introduits dans un ballon renfermant une solution de 0,5 gramme de triacétylcellulose commercialisée par la société Fluka de masse molaire 37000 et dont le degré de substitution est de 2,48 et 0,4 gramme d'anhydride diacétyltartrique dans 50 mL de pyridine. Laisser sous agitation pendant quelques minutes et évaporer lentement le solvant sous pression réduite à environ 60°C. Chauffer à sec à 120°C pendant 1,5 heure. Laisser refroidir et reprendre par 50 mL de chloroforme sous agitation magnétique à la température ambiante pendant 2 heures et terminer en portant à reflux pendant 2 heures. Filtrer sur verre fritté, 20 laver sur filtre d'abord avec du chloroforme puis avec de l'acétone. Sécher ; on obtient environ 3 grammes de support. Analyse centésimale : C 10,19%. Si cette silice est ensuite lavée de nouveau avec de la pyridine à la température ambiante pendant 2,5 heures sous agitation magnétique, filtrée et lavée sur filtre avec du chloroforme et de l'éther diéthylique, l'analyse centésimale indique alors 9,60% de carbone.

30 Exemple 2 :

On procède comme dans l'exemple 1 mais en partant d'une  $\gamma$ -aminopropylsilice (analyse centésimale : C 5,35%, H 1,68% et N 1,88%) obtenue à partir de la même silice vierge que celle utilisée dans l'exemple 1. Analyses centésimales : avant lavage avec de la pyridine 35 %C=14,62 ; après lavage avec de la pyridine %C=12,55.

On note à partir de ces deux exemples :

- Que le dérivé de polysaccharide, en l'occurrence un produit commercial, a bien été rendu insoluble dans des solvants énergiques tels que le chloroforme à ébullition et l'acétone par une réaction de réticulation.
- 5 - Que si l'on tient compte du pourcentage de carbone dans la silice aminopropyle de départ, le taux de fixation du dérivé de cellulose sur le support est sensiblement le même sur l'aminopropylsilice que sur la silice vierge. Il est donc raisonnable de penser que l'insolubilisation du dérivé de polysaccharide est bien due essentiellement à la réticulation de ses chaînes.

10

Exemple 3 :

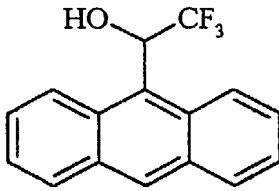
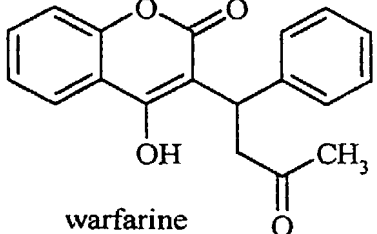
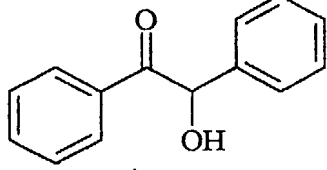
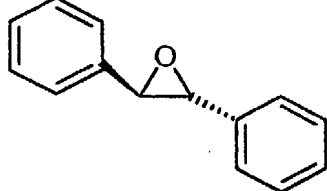
2,6 grammes de silice de diamètre des particules 5  $\mu\text{m}$  et de porosité 100 angströms sont introduits dans un ballon renfermant une solution de 0,55 gramme de tris(3,5-diméthylphényl)cellulose préparé selon les méthodes décrites dans la littérature à partir  
15 d'une cellulose Avicel® et dont le degré de substitution calculé à partir de son analyse centésimale est 2,83 et 0,4 gramme de 1,6-diisocyanohexane dans un mélange de 5 mL de pyridine et 35 mL de chloroforme. Laisser sous agitation magnétique pendant quelques minutes et évaporer lentement le solvant sous pression réduite à environ 60°C. Chauffer à sec le solide obtenu à 150°C pendant 2 heures. Laisser refroidir et reprendre par 50 mL de  
20 chloroforme sous agitation magnétique à la température ambiante pendant environ 2 heures et terminer en portant à reflux pendant 2 heures. Filtrer sur verre fritté, laver sur filtre d'abord avec du chloroforme puis avec de l'acétone. Sécher ; on obtient environ 3 grammes de support. Analyse centésimale : C 18,93 % ; H 2,73% ; N 2,73%.

25 Exemple 4 :

On procède ici avec les mêmes produits et proportions que dans l'exemple 3 jusqu'à isolation de la silice imprégnée du dérivé de cellulose et du diisocyanate à l'état sec. Disperser le solide obtenu dans 50 mL de n-heptane contenant 0,5 mL de pyridine et 0,3 mL de 1,6-diisocyanohexane et chauffer à reflux pendant 20 heures. Filtrer et reprendre le  
30 solide dans 50 mL de chloroforme sous agitation magnétique à la température ambiante pendant 2 heures et terminer en portant à reflux pendant 2 heures. Filtrer sur verre fritté, laver sur filtre d'abord avec du chloroforme puis avec de l'acétone. Sécher ; on obtient environ 3 grammes de support. Analyse centésimale : C 17,08 % ; H 2,40% ; N 2,23%.

35 Exemples d'application :

Deux colonnes chromatographiques de dimensions 15x0,46 cm remplies avec les phases stationnaires préparées selon les exemples 3 et 4 ont donné les résultats figurant dans le tableau ci-dessous. L'éluant est un mélange de n-heptane et 2-propanol dans les proportions 9 : 1 (volume : volume) et le flux de 1 mL/min.  $k'_1$  = facteur de capacité de l'énantiomère élué en premier ;  $\alpha$  = facteur de sélectivité ;  $R_s$  = facteur de résolution.

Composé racémique	Selon exemple 3			Selon exemple 4		
	$k'_1$	$\alpha$	$R_s$	$k'_1$	$\alpha$	$R_s$
 trifluoroanthryléthanol	2,10	2,27	2,10	0,69	2,08	2,65
 warfarine	2,17	1,78	1,51	0,69	2,10	2,26
 benzoïne	2,62	1,37	0,97	0,71	1,41	1,54
 <i>trans</i> -stilbène oxyde	0,65	1,78	1,58	0,40	1,54	1,56

## REVENDICATIONS

1. Dérivé de polysaccharide réticulé caractérisé en ce que sa réticulation se fait par les fonctions alcool libres résiduelles toujours présentes dans tout dérivé de polysaccharide, qu'il soit du commerce ou préparé sans contrainte particulière par les méthodes classiques décrites dans la littérature chimique.
2. Dérivé de polysaccharide réticulé selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un dérivé de cellulose, d'amylose, d'amylopectine ou de chitosan.
3. Dérivé de polysaccharide réticulé selon la revendication 1 caractérisé en ce que les substituants portés par ses unités glucose sont des groupements ester  $-O-CO-R$  ou des groupements carbamate  $-O-CO-NH-R$  ou des groupements ester et carbamate
4. Dérivé de polysaccharide réticulé selon la revendication 1 caractérisé en ce que le symbole R des groupements ester  $-O-CO-R$  et carbamate  $-O-CO-NH-R$  portés par ses unités glucose représente un groupe alkyle ou aryle ou arylalkyle ou alkylaryle dans lesquels les chaînes alkyle, de 1 à 6 atomes de carbone, peuvent être linéaires ou ramifiées et les noyaux benzéniques substitués ou non par un ou plusieurs atomes ou groupes identiques ou différents choisis parmi les atomes d'halogène et les groupes alkyl ou alkoxy de 1 à 3 atomes de carbone.
5. Phase stationnaire chirale utile pour la séparation d'isomères optiques et notamment le dédoublement de composés racémiques par les techniques chromatographiques, caractérisée en ce que le sélecteur chirale est un dérivé de polysaccharide selon la revendication 1 réticulé sur un support.
6. Phase stationnaire chirale utile pour la séparation d'isomères optiques et notamment le dédoublement de composés racémiques par les techniques chromatographiques caractérisée en ce que le sélecteur chirale est un dérivé de polysaccharide selon la revendication 1 réticulé à l'état pur.
7. Phase stationnaire chirale utile pour la séparation de composés chiraux par chromatographie selon la revendication 5 caractérisée en ce que le support est choisi parmi la silice, la silice inactivée, l'alumine, l'oxyde de zirconium, le graphite ou des matériaux comme le papier ou d'autres macromolécules naturelles ou synthétiques.
8. Phase stationnaire chirale utile pour la séparation de composés chiraux par chromatographie selon la revendication 6 caractérisée en ce que le dérivé de polysaccharide est utilisé sous forme de microbilles.

9. Méthode d'obtention d'un dérivé de polysaccharide réticulé selon la revendication 1 caractérisée en ce que la réaction de réticulation sur un support se fait selon :

5 a) dissolution dans un solvant organique approprié du dérivé de polysaccharide à réticuler et d'un réactif capable de réagir avec au moins deux fonctions alcool résiduelles libres du dérivé de polysaccharide, imprégnation du support chromatographique, évaporation du solvant sous pression réduite vers 60°C, chauffage à sec entre 80 et 150°C pendant 1 à 2 heures et terminer par un lavage avec du chloroforme à reflux et de l'acétone à température ambiante.

10 ou :

b) dissolution dans un solvant organique approprié du dérivé de polysaccharide à réticuler et d'un réactif capable de réagir avec au moins deux fonctions alcool résiduelles libres du dérivé de polysaccharide, imprégnation du support chromatographique, évaporation du solvant sous pression réduite vers 60°C, disperser le produit dans un solvant dans lequel le dérivé de polysaccharide n'est pas soluble tel que l'heptane, chauffer à reflux de 10 à 20 heures, filtrer et terminer par un lavage avec du chloroforme à reflux et de l'acétone à température ambiante.

10. Méthode d'obtention d'un dérivé de polysaccharide réticulé selon la revendication 1 caractérisée en ce que la réaction de réticulation à l'état pur se fait selon :

25 a) imprégnation du polysaccharide à réticuler sous forme de microbilles ou feuilles avec un réactif capable de réagir avec au moins deux fonctions alcool résiduelles libres du dérivé de polysaccharide en solution dans un solvant dans lequel ledit dérivé n'est pas soluble tel que l'heptane, évaporation du solvant sous pression réduite vers 60°C, chauffage à sec entre 80 et 150°C pendant 1 à 2 heures et terminer par un lavage avec du chloroforme à reflux et de l'acétone à température ambiante.

ou :

30 b) imprégnation du polysaccharide à réticuler sous forme de microbilles ou feuilles avec un réactif capable de réagir avec au moins deux fonctions alcool résiduelles libres du dérivé de polysaccharide en solution dans un solvant dans lequel ledit dérivé n'est pas soluble tel que l'heptane, chauffage à reflux pendant 10 à 20

heures et terminer par un lavage du dérivé de polysaccharide réticulé avec du chloroforme à reflux et de l'acétone à température ambiante.

- 5 11. Phase stationnaire chirale utile pour la séparation de composés chiraux par chromatographie préparée selon la revendication 9 caractérisée en ce que le dérivé de polysaccharide réticulé sur un support, organique ou minéral, est un ester ou un carbamate ou à la fois ester et carbamate de cellulose, d'amylose, d'amylopectine ou de chitosan.
- 10 12. Phase stationnaire chirale utile pour la séparation de composés chiraux par chromatographie préparée selon la revendication 10 caractérisée en ce qu le dérivé de polysaccharide réticulé sous forme de microbilles est un ester ou un carbamate ou à la fois ester et carbamate de cellulose, d'amylose, d'amylopectine ou de chitosan.
- 15 13. Méthode d'obtention d'un dérivé de polysaccharide réticulé selon les revendications 9 et 10 caractérisée en ce que le réactif de réticulation est un anhydride ou un chlorure de diacide, un diacide, un diisocyanate ou un diépoxyde.
- 20 14. Membrane chirale utile pour la séparation d'isomères optiques et notamment le dédoublement de composés racémiques, caractérisée en ce qu'elle est constituée d'un dérivé de polysaccharide réticulé selon la revendication 10.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/01007

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7	C08B15/00	C08B15/06	C08B15/10	C08B3/00	C08B3/22
	C08B31/00	C08B33/00	C08B33/02	C08B35/00	C08B35/02
	C08B37/08	C07B57/00	G01N30/48	B01J20/22	B01J20/32

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C08B C07B G01N B01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 889 561 A (SUGIHARA ET AL.) 26 December 1989 (1989-12-26) claims; examples ---	1-4
X	EP 0 656 333 A (DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 7 June 1995 (1995-06-07) abstract page 2, line 35 - line 46 page 2, line 52 - page 6, line 16 page 5; example 1 claims ----- -/--	1-5, 7, 9, 11, 13



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 September 2003

Date of mailing of the international search report

22/09/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mazet, J-F

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/01007

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 281 951 A (DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 14 September 1988 (1988-09-14) abstract claims page 3, line 29 - line 32 page 3, line 56 -page 4, line 39 page 4, line 33 - line 34 ---	1-14
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 016, no. 066 (C-0912), 19 February 1992 (1992-02-19) & JP 03 261729 A (CHISSO CORP), 21 November 1991 (1991-11-21) abstract ---	1,2,6,8, 10,12
A	EP 0 157 364 A (DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 9 October 1985 (1985-10-09) page 5, line 10 - line 16 page 8, line 1 -page 9, line 12 page 10, line 16 - line 20 ---	5-8, 11-14
A	EP 0 527 236 A (DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 17 February 1993 (1993-02-17) page 3, line 46 - line 52 page 3, line 18 - line 29; claims -----	6,8,10, 12

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 03/01007

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4889561	A	26-12-1989	NONE	
EP 656333	A	07-06-1995	JP 3190206 B2	23-07-2001
			JP 8059702 A	05-03-1996
			DE 69412973 D1	08-10-1998
			DE 69412973 T2	14-01-1999
			EP 0656333 A1	07-06-1995
			KR 184294 B1	15-05-1999
			US 5587467 A	24-12-1996
			CN 1111057 A ,B	01-11-1995
			WO 9500463 A1	05-01-1995
EP 281951	A	14-09-1988	JP 1203402 A	16-08-1989
			JP 2563433 B2	11-12-1996
			DE 3850148 D1	21-07-1994
			DE 3850148 T2	22-09-1994
			EP 0281951 A1	14-09-1988
			EP 0552824 A2	28-07-1993
			US 4861872 A	29-08-1989
			JP 2108559 C	21-11-1996
			JP 8013844 B	14-02-1996
			JP 63178101 A	22-07-1988
JP 03261729	A	21-11-1991	JP 2896589 B2	31-05-1999
EP 157364	A	09-10-1985	JP 1833355 C	29-03-1994
			JP 5033210 B	19-05-1993
			JP 60226832 A	12-11-1985
			JP 1787409 C	10-09-1993
			JP 4075215 B	30-11-1992
			JP 60226833 A	12-11-1985
			DE 3579723 D1	25-10-1990
			EP 0157364 A2	09-10-1985
			US 4786415 A	22-11-1988
			US 5334311 A	02-08-1994
			US 4892659 A	09-01-1990
			US 5415769 A	16-05-1995
			US 5472599 A	05-12-1995
			US 5041226 A	20-08-1991
			US 5089138 A	18-02-1992
			US 5192444 A	09-03-1993
			US 5268098 A	07-12-1993
			US 4931184 A	05-06-1990
			US 5032277 A	16-07-1991
			US 5135653 A	04-08-1992
EP 527236	A	17-02-1993	DE 69226578 D1	17-09-1998
			DE 69226578 T2	24-12-1998
			EP 0527236 A1	17-02-1993
			US 5354852 A	11-10-1994
			JP 3181349 B2	03-07-2001
			JP 5070599 A	23-03-1993
			WO 9215635 A1	17-09-1992

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 03/01007

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> CIB 7    C08B15/00    C08B15/06    C08B15/10    C08B3/00    C08B3/22 C08B31/00    C08B33/00    C08B33/02    C08B35/00    C08B35/02 C08B37/08    C07B57/00    G01N30/48    B01J20/22    B01J20/32					
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB					
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b> Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7    C08B    C07B    G01N    B01J					
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche					
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, EPO-Internal					
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>					
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents				no. des revendications visées
X	US 4 889 561 A (SUGIHARA ET AL.) 26 décembre 1989 (1989-12-26) revendications; exemples ---				1-4
X	EP 0 656 333 A (DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 7 juin 1995 (1995-06-07) abrégé page 2, ligne 35 - ligne 46 page 2, ligne 52 -page 6, ligne 16 page 5; exemple 1 revendications --- <div style="text-align: right;">-/--</div>				1-5,7,9,11,13
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span><input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents</span> <span><input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe</span> </div>					
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>*I* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>*X* document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>*Y* document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>*S* document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>					
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-weight: bold;">15 septembre 2003</div>			Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-weight: bold;">22/09/2003</div>		
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016			Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Mazet, J-F</div>		

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 03/01007

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 281 951 A (DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 14 septembre 1988 (1988-09-14) abrégé revendications page 3, ligne 29 - ligne 32 page 3, ligne 56 - page 4, ligne 39 page 4, ligne 33 - ligne 34 ----	1-14
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 016, no. 066 (C-0912), 19 février 1992 (1992-02-19) & JP 03 261729 A (CHISSO CORP), 21 novembre 1991 (1991-11-21) abrégé ----	1,2,6,8, 10,12
A	EP 0 157 364 A (DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 9 octobre 1985 (1985-10-09) page 5, ligne 10 - ligne 16 page 8, ligne 1 - page 9, ligne 12 page 10, ligne 16 - ligne 20 ----	5-8, 11-14
A	EP 0 527 236 A (DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 17 février 1993 (1993-02-17) page 3, ligne 46 - ligne 52 page 3, ligne 18 - ligne 29; revendications -----	6,8,10, 12

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 03/01007

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 4889561	A	26-12-1989	AUCUN	
EP 656333	A	07-06-1995	JP 3190206 B2	23-07-2001
			JP 8059702 A	05-03-1996
			DE 69412973 D1	08-10-1998
			DE 69412973 T2	14-01-1999
			EP 0656333 A1	07-06-1995
			KR 184294 B1	15-05-1999
			US 5587467 A	24-12-1996
			CN 1111057 A ,B	01-11-1995
			WO 9500463 A1	05-01-1995
EP 281951	A	14-09-1988	JP 1203402 A	16-08-1989
			JP 2563433 B2	11-12-1996
			DE 3850148 D1	21-07-1994
			DE 3850148 T2	22-09-1994
			EP 0281951 A1	14-09-1988
			EP 0552824 A2	28-07-1993
			US 4861872 A	29-08-1989
			JP 2108559 C	21-11-1996
			JP 8013844 B	14-02-1996
			JP 63178101 A	22-07-1988
JP 03261729	A	21-11-1991	JP 2896589 B2	31-05-1999
EP 157364	A	09-10-1985	JP 1833355 C	29-03-1994
			JP 5033210 B	19-05-1993
			JP 60226832 A	12-11-1985
			JP 1787409 C	10-09-1993
			JP 4075215 B	30-11-1992
			JP 60226833 A	12-11-1985
			DE 3579723 D1	25-10-1990
			EP 0157364 A2	09-10-1985
			US 4786415 A	22-11-1988
			US 5334311 A	02-08-1994
			US 4892659 A	09-01-1990
			US 5415769 A	16-05-1995
			US 5472599 A	05-12-1995
			US 5041226 A	20-08-1991
			US 5089138 A	18-02-1992
			US 5192444 A	09-03-1993
			US 5268098 A	07-12-1993
			US 4931184 A	05-06-1990
			US 5032277 A	16-07-1991
			US 5135653 A	04-08-1992
EP 527236	A	17-02-1993	DE 69226578 D1	17-09-1998
			DE 69226578 T2	24-12-1998
			EP 0527236 A1	17-02-1993
			US 5354852 A	11-10-1994
			JP 3181349 B2	03-07-2001
			JP 5070599 A	23-03-1993
			WO 9215635 A1	17-09-1992